

TruLight™ Kinase Assay FAQ集



Merck社
「TruLight™ Kinase Assay Kits : FAQ」

Merck Biosciences

Calbiochem | Novabiochem | Novagen

Merck, Ltd.

メーカー略号：CBC



・ TruLight™ Kinase Assay Kit シリーズ
※商品案内25ページ参照

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the Merck, Ltd. for providing TruLight™ information presented here.

Q-1 : TruLight™テクノロジーは新しいキナーゼターゲットや様々な基質に容易に利用できますか？

TruLight™はリン酸化された基質が金属イオンと結合することで蛍光シグナル強度が変化することを利用したテクノロジーで、原理的にはほぼすべてのポリペプチド、脂質またはポリヌクレオチド基質を用いたほぼすべてのキナーゼのアッセイの開発に適応でき、幅広い利用が可能です。

Q-2 : TruLight™アッセイの感度はどれくらいですか？

検出限界はアッセイごとに異なりますが、ほとんどのアッセイの検出限界は100pg以下です。詳しい情報は各取扱説明書に記載されています。

Q-3 : 蛍光の測定にはどんなフィルターが必要ですか？

励起波長は約450nm、発光波長は約490nm、カットオフは475nmです。

Q-4 : TruLight™アッセイの蛍光シグナルの発生源は何ですか？

本アッセイは、ラテックス製のマイクロスフェアビーズの表面にコーティングした蛍光ポリマー（長鎖の発色団）です。リン酸結合のための金属イオン (Ga^{3+}) を利用しています。

Q-5 : TruLight™テクノロジーがFRETより優れている点は何ですか？

TruLight™アッセイは、ポリマー蛍光発色団を用いているため、リン酸化部位と発色団の距離に依存しないため、感度が高く、大きな完全長の天然タンパク質にも利用できます。TruLight™アッセイは、一般にFRETより少なくとも1桁感度が高いので、より強力なアッセイが可能で試薬のコストを低く抑えられます。

ポリマーの蛍光発色団は、クエンチャー分子が近づくと、固有の電子構造が分子間/分子内エネルギー移動を引き起こし、多くの発色団分子が一度に多く消光されます。これは「スーパークエンチング」と呼ばれ、分子間距離が離れた蛍光原子もクエンチされることにより、FRETの場合より優れた消光能を発揮します。FRETアッセイでは、距離依存性が高いため、アミノ酸数が10以上のペプチドでは性能が著しく低下します。

Q-6 : TruLight™アッセイにはどんな蛍光光度計が使用できますか？

本アッセイには、励起用450nm・発光用490nmの適切なフィルターを備えた蛍光光度計であれば使用することができます。

Q-7 : TruLight™アッセイはハイスループット用に利用できますか？アッセイを自動化することはできますか？

できます。本アッセイは、96、384、1536、および3456ウェルプレートで行うことができます。アッセイの自動化は可能です。各種マイクロプレートのロボットに適用してください。

Q-8 : TruLight™マイクロスフェアは「懸濁粒子」ですか？

一般にマイクロスフェアは、液体に分散させると懸濁し、粒径が大きいほど沈殿を生じやすくなります。本アッセイに使用するマイクロスフェアは、粒径が約500nmであり、数時間懸濁状態に保たれます。

Q-9：ポリマーは均一にコーティングされていますか？

マイクロスフェアはポリマーで均一に単層コーティングされています。

統計的にポリマーコーティングは均一です。ポリマー分子中の特定の結合部位がマイクロスフェア表面に効率よく単層にコーティングされるために十分な注意が払われています。結合基数とポリマー繰り返し単位数の分析から、コーティングされたマイクロスフェアの大部分がポリマー単分子層で覆われていることがわかっています。

Q-10：シグナルはどれくらいの時間ですか？

消光反応の安定性は、アッセイ条件、アッセイバッファー、および基質の影響を受けます。ポリマーは、明るい直射可視光/UV光に当てなければ、数時間は安定です（一般に30分～6時間安定。ただしアッセイごとに異なり、さらに長時間の場合もあります）。センサーは、通常の白色光では非常に安定ですが、良好な結果を安定的に得るために必ず暴露時間を短くしてください。製品ごとの情報は取扱説明書に記載されています。

Q-11：アッセイの速度や感度を向上させることはできますか？

本アッセイは、約60分で最大感度を示すように最適化されています。アッセイの迅速化やシグナルの増強が必要な場合には、酵素の量または反応時間を増大させてください。

Q-12：黒や透明のプレートでアッセイを行うことはできますか？

本アッセイは、白色の96ウェルプレートで行うように最適化されていますが、黒や透明のプレートでも同様に行うことができます。実際に得られるカウントは異なってきますが、アッセイ性能には影響はありません。

Q-13：1アッセイあたりの反応ボリュームはどれくらいですか？

本アッセイは、総量60μlで行います。

Q-14：ペプチド基質の大きさに限度はありますか？

本アッセイは、長鎖・短鎖ペプチドどちらにも適しています。テスト済みの最も長いペプチドは43残基です。タンパク質にも利用できます。

Q-15：ATP耐性はどれくらいですか(妨害しないATP濃度はいくつまでですか)？

ATP耐性は基質ごとに異なります。ATP濃度が非常に高いと、リン酸化された基質へのセンサーの結合が妨げられます。妨害は、ペプチド基質の構造とアッセイバッファーの組成に左右されます。ほとんどのアッセイでは50～100μMの範囲で最適な性能が得られ、1mMまでのATPに耐えられます。

Q-16：アッセイの再現性Z係数はどれくらいですか？

ほとんどのアッセイのZ係数は、基質変換率10%で通常0.6以上です。

Q-17：アッセイの変動係数はどれくらいですか？

ほとんどのアッセイでCVは5%以下です。

Q-18：アッセイのDMSO耐性はどれくらいですか？

DMSO耐性はアッセイごとに異なり、具体的な値は各取扱説明書に記載されています。通常5～20%です。

Q-19：アッセイを妨害する物質はどのようなものですか？

様々な低分子有機化合物、生体タンパク質、または無機塩類は、HTSに用いられる濃度では著しい妨害を与えません。具体的にはアッセイごとに異なりますので、取扱説明書を参照ください。蛍光アッセイにおける化合物の妨害について文献(Turek-Etienne, T. C., *et al.* 2003. J Biomol Screen. 8, 176)が有用です。

Q-20：阻害剤をアッセイに使用できますか？

対象キナーゼの阻害剤スクリーニングにも使用できます。

ただし蛍光を消光したり、ペプチド基質と反応する可能性のある化合物は、本アッセイに使用することはできません。アッセイ波長で高レベルの蛍光を示す有色化合物も使用できません(同Turek-Etienne, T. C., *et al.* 2003. J Biomol Screen. 8, 176)。